



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08029427 A**(43) Date of publication of application: **02.02.96**

(51) Int. Cl.

G01N 33/576
G01N 33/53
G01N 33/577

(21) Application number: **06183904**(22) Date of filing: **12.07.94**(71) Applicant: **TONEN CORP INTERNATL
REAGENTS CORP**

(72) Inventor: **KASHIWAGUMA TOMIKO
YAGI SHINTARO
HASEGAWA AKIRA
KAJITA TADAHIRO
OTA YOSUKE
MORI HIROYUKI**

(54) **IMMUNOASSAY OF NON-A, NON-B HEPATITIS
VIRUS ASSOCIATED ANTIGEN, MONOCLONAL
ANTIBODY USED THEREFOR, AND HYBRIDOMA
FOR PRODUCING THIS ANTIBODY**

(57) Abstract:

PURPOSE: To detect and quantitatively determine non-A, non-B hepatitis virus CORE structural protein in a specimen by producing a monoclonal antibody, which performs specific bonding to an antigen determination region, from a hybridoma cell line.

CONSTITUTION: A specimen (for example, blood serum) together with polyethylene glycol is subjected to centrifuging and precipitate thereof is alkaline-

processed to concentrate and decompose a virus particle. A mouse is immunized by non-A, non-B hepatitis virus CORE structural protein of this virus particle, and a lymphatic corpuscle derived from this and a myeloma cell are subjected to blending so as to obtain a hybridoma cell line. A monoclonal antibody produced by culturing this cell line is specifically bonded to an antigen determination region on the non-A, non-B hepatitis virus CORE structural protein. Accordingly, by using this monoclonal antibody, the non-A, non-B hepatitis virus CORE structural protein can be detected and quantitatively determined.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-29427

(43)公開日 平成8年(1996)2月2日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	33/576	Z		
	33/53	D		
	33/577	B		

審査請求 未請求 請求項の数20 F D (全 17 頁)

(21)出願番号 特願平6-183904

(22)出願日 平成6年(1994)7月12日

(71)出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 柏熊 富子

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1

号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 八木 慎太郎

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1

号 東燃株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 耕平 (外3名)

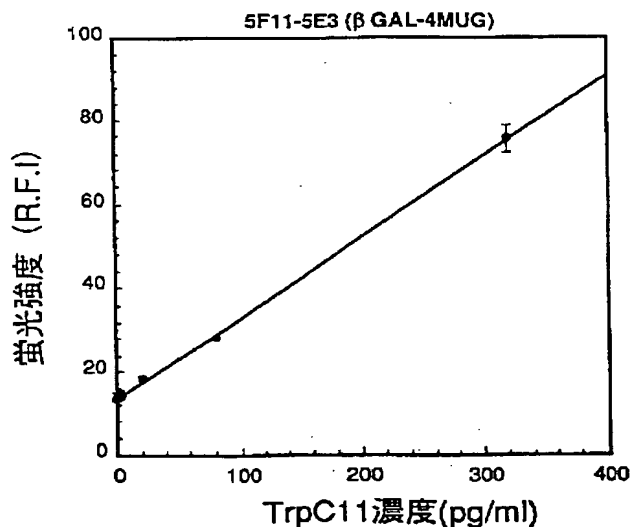
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非A非B型肝炎ウイルス関連抗原のイムノアッセイ、それに使用するモノクローナル抗体、およびこの抗体を産生するハイブリドーマ

(57)【要約】

【構成】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体、その製造方法、該モノクローナル抗体を用いた非A非B型肝炎ウイルス関連抗原のイムノアッセイ、およびこのイムノアッセイを実施するための検査キット。

【効果】 モノクローナル抗体は、非A非B型肝炎の患者血清中の非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質を特異的に認識するため、非A非B型肝炎の各種免疫学的診断薬の抗体として広く応用することができ、非A非B型肝炎の確定診断が行なえる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

【請求項2】 HC11-5E3, HC11-5F11, HC11-515S及びHC11-1080Sから成る群から選択される請求項1に記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項3】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対する結合特異性を有する請求項1又は2に記載のハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体。

【請求項4】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位として配列番号1に示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも3個の連続するアミノ酸配列を認識する請求項3に記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位として配列番号3に示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも3個の連続するアミノ酸配列を認識する請求項3に記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質上の抗原決定部位として配列番号4に示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも3個の連続するアミノ酸配列を認識する請求項3に記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位として配列番号5に示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも3個の連続するアミノ酸配列を認識する請求項3に記載のモノクローナル抗体。

【請求項8】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質との抗原-抗体複合体の結合定数 K_A が 5×10^7 [M⁻¹]以上である請求項3～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質で免疫したマウスから誘導されるリンパ球とミエローマ細胞とを融合することにより請求項1記載のハイブリドーマ細胞系を作製し、この細胞系を培養して非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位と特異的に結合するモノクローナル抗体を分泌させ、これを精製することを包含する、請求項3～8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 ハイブリドーマ細胞系がHC11-5E3, HC11-5F11, HC11-515S及びHC11-1080Sから成る群から選択される請求項9に記載の方法。

【請求項11】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質が配列番号1に示されるアミノ酸配列またはその部分配列を有する請求項9に記載の方法。

【請求項12】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質が配列番号2に示されるアミノ酸配列またはその部分配列を有する請求項9に記載の方法。

【請求項13】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質が配列番号3に示されるアミノ酸配列またはその部分配列を有する請求項9に記載の方法。

【請求項14】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質が配列番号4に示されるアミノ酸配列またはその部分配列を有する請求項9に記載の方法。

【請求項15】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質が配列番号5に示されるアミノ酸配列またはその部分配列を有する請求項9に記載の方法。

10 【請求項16】 検体中の非A非B型肝炎ウイルス関連抗原のイムノアッセイであって、(a)前記検体中の非A非B型肝炎ウイルス又はその関連抗原をポリエチレングリコールと共に遠心濃縮し、次いでアルカリで処理する段階、(b)該検体と請求項3～8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を接触させて抗原-抗体複合体を形成させる段階、(c)該抗原-抗体複合体の存在、およびこれにより前記非A非B型肝炎ウイルス関連抗原の存在を検出ならびに定量する段階、を含む前記イムノアッセイ。

20 【請求項17】 さらに、モノクローナル抗体を標識することを含む請求項16記載のイムノアッセイ。

【請求項18】 請求項16又は17に記載のイムノアッセイを実施するための検査キット。

【請求項19】 非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対し結合特異性を有する5E3, 5F11, 515S及び1080Sから成る群から選択される少なくとも1種のモノクローナル抗体と、標識された5E3, 5F11, 515S及び1080Sから成る群から選択される第二抗体との組み合わせで構成される請求項18に記載の検査キット。

30 【請求項20】 請求項3～8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む請求項18に記載の検査キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、検体中の非A非B型肝炎ウイルスの構造領域CORE蛋白質を検出または定量するイムノアッセイ、ならびにこのイムノアッセイに使用するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を含む検査キットに関する。

【0002】

【従来の技術】輸血後肝炎は、その名の通り輸血によって引き起こされる肝炎を意味する。この輸血後肝炎の原因ウイルスとして、最初にB型肝炎ウイルス(HBV)が同定されたが、この発見により輸血後肝炎の原因ウイルスがHBV1種のみでなく、他の原因ウイルスがあることが示唆された。この原因ウイルスは非A非B型肝炎ウイルス(以下NANBVと略称する場合がある)、あるいはC型肝炎ウイルス(以下HCVと略称する場合がある)

ある)と名付けられ、その発見が待たれていた。

【0003】非A非B型肝炎は、輸血後肝炎の9割以上を占め、しかも感染者の5～8割が慢性化し、肝硬変、肝癌へと高率で移行することから、その生理学的および生理的機能について大きな感心が持たれていた。この非A非B型肝炎の診断に関しては、初期にはA型肝炎、B型肝炎およびD型肝炎、さらには肝障害を引き起こす既知のウイルス(例えば、サイトメガロウイルスやエプスタインバーウイルス)による肝炎か否かの診断を行なった後、これらに該当しない場合に非A非B型肝炎と診断する、いわゆる除外診断法が主流であった。

【0004】その後、本ウイルスに関しては、1989年ChooらのグループによりNANBV感染チンパンジーの血漿から遺伝子がクローニングされ(Science 244:359-362, 1989)、その遺伝子の非構造蛋白領域の一部(NS3～NS4)を酵母に組み込んで得られたリコンビナント抗原を用いた抗体測定による診断法が開発された(Science 244:362-364, 1989);特表平2-500880号公報)。

【0005】第1世代診断薬として米国カイロン社で開発されたリコンビナント抗原(c100-3蛋白質)を用いた試薬では、慢性非A非B型肝炎患者の7～8割で陽性を示すことが明らかとなったが、感染初期にはc100-3抗体価が上昇せず検出できないため、感染していても検出できないケースや自己免疫疾患患者の血清や高γグロブリン血清などではかなり非特異反応が見られることがわかってきた。

【0006】その後、ウイルスの構造蛋白であるCORE抗原を加えた第2世代診断薬の開発により、約9割の患者を検出することが可能となっているが、散発性非A非B型肝炎患者の検出率は約4割に過ぎない。また、これら抗体検出法以外に、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応法)法(Science 230:1350-1354, 1985)やDNAプローブ法による非A非B型肝炎ウイルス遺伝子の存在の有無を確認する遺伝子検出法が開発されている。

【0007】しかし、PCR法を用いた検査法には、いくつかの困難な問題が存在している。例えば、PCR法を行なうためには、非A非B型肝炎ウイルスがRNAウイルスであることからDNAへの逆転写が必須となり、RNAからDNAへの転写の際にロスを生じやすいこと、特殊な増幅設備等を必要とし、かつ操作が煩雑であることから一度に大量の検体を処理することができないこと、さらにはコンタミネーションを起こしやすいことなどが挙げられる。

【0008】一方、非A非B型肝炎ウイルスは、体内でのウイルス量が少ないことや*in vitro*での増殖系が確立していないために、現在でもネイティブなウイルス粒子や精製ウイルス蛋白を用いた免疫血清は得られて

いない。ヒト血清は、個体によって抗原に対する抗体の産生が異なり、高い抗体価を示すものや、全く抗体を産生しない個体がある。また、ある領域の抗原に対する抗体は含んでいるが、他の領域の抗原に対する抗体は全く含んでいない個体もある。さらにポリクローナル抗体であるために、非A非B型肝炎ウイルス以外の物質に対する抗体も含んでおり、交差反応等も充分考慮して結果を判定しなければならない。

【0009】従って、抗体で未知の抗原評価を行なう場合には、十分な注意が必要となる。このような状況の中で、確定診断のためのウイルス検出法が注目されている。

【0010】本発明以前に非A非B型肝炎ウイルスに対するモノクローナル抗体に関して、欧州特許第318,216号および同第388,232号などの特許明細書において、当業者により容易に産生できるとの記載がなされているが、その可能性が推測されているだけであり、具体例は示されていない。これとは別に、非A非B型肝炎ウイルスのCORE蛋白質上のエピトープに対して特異性を有するモノクローナル抗体も開示(特開平5-260960号公報)されているが、本発明とはモノクローナル抗体の製造方法が異なり、認識するエピトープならびに測定法、検出感度など全く異なるものである。

【0011】

【発明が解決しようとする問題点】非A非B型肝炎ウイルスは、RNAウイルス種で一般的に観察される高度の変異を起こすことが知られている。また上述したように、感染患者内ではウイルス粒子自体が極めて少なく、そのため患者血中に含まれる該ウイルス関連抗原に対する抗体量も少ないことから、依然として抗体検出試薬では検出できない患者が存在する。また、非A非B型肝炎は予防法が確立されていないばかりか、感染者(キャリア)の多くは10～30年で肝硬変や肝癌へ移行することが推定されており、早期発見と早期治療が重要であることは言うまでもない。近年、慢性疾患の患者に対してインターフェロン(以下IFNと略す)投与等の治療法が効果を上げているが、IFN治療によって肝機能異常を鎮静化できるとは限らず、IFN投与終了後に再発する症例も多く報告され、非A非B型肝炎ウイルスを完全に排除するのは困難であるのが現状である。寧ろ、治療や予後の推定にとって重要なのは病態の把握であり、単に抗体を検出するだけでなく、より意義のあるウイルス関連マーカー(抗原)の測定が強く望まれている。

【0012】すなわち、血清中の非A非B型肝炎ウイルス粒子、特にウイルス関連抗原を簡便かつ高収率で得られる方法と、その検出および定量法の開発が望まれている。

【0013】従って、本発明の目的は、検体中の非A非B型肝炎ウイルス関連抗原を濃縮し、変性させるための

簡便な処理方法を提供することである。

【0014】本発明の別の目的は、非A非B型肝炎ウイルス関連抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体および該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマおよびこれらを産生するための方法を提供することである。

【0015】本発明のさらに別の目的は、該モノクローナル抗体を用いて非A非B型肝炎ウイルス関連抗原を高感度で検出ならびに定量するための測定方法を提供することである。

【0016】

【問題点を解決するための手段】本発明者らは、これまでに非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質領域に関して、モノクローナル抗体による抗原検出法を鋭意研究してきた。その結果、検体（例えば血清）をポリエチレングリコールと共に遠心し、沈殿物をアルカリ処理を行なうことによりウイルス粒子を濃縮ならびに分解できることを見いだした。さらに、CORE構造蛋白質遺伝子を大腸菌で発現させたHCV抗原活性を有するリコンビナントポリペプチドを免疫原として、HCV構造蛋白質に非常に特異的なモノクローナル抗体を得ることに成功し、さらに該モノクローナル抗体とウイルス粒子のCORE構造蛋白質とが特異的に反応することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0017】従って、本発明は、非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【0018】具体的には、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む非A非B型肝炎ウイルスのCORE構造蛋白質遺伝子断片を含む組換えベクターで宿主細胞を形質転換した後、この形質転換宿主を培養せしめ、非A非B型肝炎ウイルス抗原活性を有する配列番号1に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを製造し、該ポリペプチドを免疫原とするモノクローナル抗体作製法に基づいて、本発明のモノクローナル抗体を製造することができる。モノクローナル抗体は、上記非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質で免疫したマウスから誘導されるリンパ球とミエローマ細胞とを融合することにより産生したハイブリドーマ細胞系から得られ、非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質の検出ならびに定量のためのイムノアッセイおよび検査キットに使用し得る。

【0019】従って、本発明は、このようなハイブリドーマ細胞系、イムノアッセイおよび検査キットをも提供する。

【0020】さらに本発明は、配列番号2～5に示されるアミノ酸配列またはその部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体、この抗体を用いることを特徴とする非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質の検出ならびに定量のためのイムノアッセイ、およびこのイムノアッセイを実施するための検査キットを提供する。

【0021】イムノアッセイは、(a)検体中の非A非B型肝炎ウイルス又はその関連抗原をポリエチレングリコールと共に遠心濃縮し、次いでアルカリで処理する段階、(b)該検体と本発明のモノクローナル抗体を接触させて抗原-抗体複合体を形成させる段階、(c)該抗原-抗体複合体の存在、およびこれにより非A非B型肝炎ウイルス関連抗原の存在を検出ならびに定量する段階を包含する。

【0022】このアッセイにおいては、検体をポリエチレングリコールと共に遠心して濃縮し、沈殿物を水酸化ナトリウム等のアルカリ剤で処理することによりウイルス粒子を分解するとともに共存する抗体を失活させる前処理法を含むことを特徴とする。さらに、非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質と免疫複合体を形成する結合定数 K_A が 5×10^7 [M^{-1}]以上、好ましくは 5×10^8 [M^{-1}]以上、さらに好ましくは 7×10^8 [M^{-1}]以上であるモノクローナル抗体を使用することが好ましい。

【0023】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0024】本発明でいう非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子断片とは、非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子のCORE領域を含む遺伝子断片であり、少なくとも非A非B型肝炎ウイルスのN末端の1番目から123番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA断片である。具体的には、配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片である。

【0025】このような非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子断片を得るには、輸血後非A非B型肝炎患者の血清からウイルス遺伝子を分離して作製したcDNAライブラリーから調製するか、または公知の非A非B型肝炎ウイルス遺伝子の塩基配列(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9524-9528, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2451-2455, 1991)からDNAプローブを合成し、上記のcDNAライブラリーを常法に従ったDNA/DNAハイブリダイゼーション、またはDNA/RNAハイブリダイゼーションを行ない、スクリーニングをして目的の遺伝子断片を得ることも可能である。

【0026】非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子断片とTrpE遺伝子を融合することによって作製される融合遺伝子は、常法の遺伝子組換え手法によって、この2つのDNAを連結することによって作製できる。非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子断片は、cDNAライブラリー作製時に付加されたリンカー由来の制限酵素部位もしくは該遺伝子断片が挿入されたプラスミド由来の制限酵素部位などを利用し、TrpE遺伝子は、該遺伝子が挿入されたプラスミド由来の制限酵素部

位もしくは遺伝子内部の制限酵素部位などを利用して両者を連結することが可能である。

【0027】本発明の融合遺伝子を含む組換えベクターは、通常の遺伝子組換え手法によって、例えばプラスミドベクターに挿入することによっても作製される。ベクターとしては、プラスミド、ファージなどの慣用のベクターの他に、ワクシニアウイルスやバキュロウイルスなどのウイルスも使用できる。

【0028】宿主として例えば大腸菌、枯草菌もしくは放線菌などの原核生物を用いることができ、また、プロモーターとしては例えばトリプトファン合成酵素オペロン (trp)、ラクトースオペロン (lac)、 λ ファージPL, PRなどを用いることができる。この場合には一般に他のペプチドとの融合体として得ることにより効率の良いリコンビナント (ポリ) ペプチドの産生が期待される。

【0029】また、酵母、昆虫細胞、植物細胞もしくは動物細胞などの真核生物を宿主として用いることも可能である。この時のプロモーターとしては、酵母などに慣用のプロモーターである3-ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼなどの解糖系酵素に対するプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼに対するプロモーター、哺乳動物細胞で使用され得るウイルスプロモーター、例えばポリオーマウイルス、アデノウイルス、サルウイルスSV-40、ワクシニアウイルスもしくはサイトメガロウイルスなど由来のプロモーターが挙げられる。

【0030】ベクターはさらに、形質転換された細胞の表現型選択を可能にするマーカー配列、例えばアンピシリン、テトラサイクリン耐性遺伝子などや複製開始点、ターミネーター、リボソーム結合部位などを適宜含む得る。

【0031】組換え非A非B型肝炎ウイルスの構造蛋白質の製造方法は、具体的には本発明の前述の核酸断片を適当な宿主細胞内で発現させ得る複製可能な発現ベクターを構築する工程、前記発現ベクターを宿主細胞内に導入して形質転換体を得る工程、前記核酸断片を発現させ得る条件下で前記形質転換体を培養して前記リコンビナント (ポリ) ペプチドを発現させる工程、および前記リコンビナント (ポリ) ペプチドを回収する工程をも包含する。以下、宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例にとり、形質転換体を得る工程より記載する。

【0032】形質転換体の方法は、塩化カルシウム法などの通常の形質転換方法を適用すればよい。例えば、後述の実施例に記載のように、組換えベクターTrp・TrpE CORE140で適当な宿主大腸菌を形質転換することにより組換え大腸菌が得られる。

【0033】形質転換大腸菌を培養する方法は、通常用いられるL培地、YT培地、M9-C A培地などの栄養豊富な大腸菌用培地で培養すればよい。上記のように作製された組換えベクターは、薬剤耐性遺伝子を有してお

り、その形質転換大腸菌を培養する場合には、それに対応する薬剤を適当な濃度になるように添加しておくことが望ましい。例えば宿主大腸菌としてHB101株を用いて組換えベクターTrp・TrpE CORE140で形質転換することにより得られた組換え大腸菌HB101 [Trp・TrpE CORE140] を培養する場合には、アンピシリンを20~200 μ g/mlの濃度になるように培地に添加しておけばよい。

【0034】融合ポリペプチド遺伝子を発現させる場合には、その上流のプロモーターを適当な方法で動かさせて発現誘導を行なえばよい。例えば前述のベクターの場合には、適当な培地である程度の菌体量に達するまで培養した後、IAA (インドールアクリル酸) を添加して、遺伝子発現を開始させる方法がとられる。効率的な遺伝子発現を行なうためには、対数増殖期の初期ないし中期にIAAを添加することが望ましい。発現誘導後、さらに培養を継続して融合ポリペプチドを菌体内に蓄積させる。例えば組換え大腸菌HB101 [Trp・TrpE CORE140] の場合には、アンピシリンを添加したM9-C A培地で、37℃で13~16時間培養することにより多くの菌体量が得られ、かつ融合ポリペプチドを高収量で得ることができる。

【0035】培養によって得られた菌体から融合ポリペプチドを採取、精製する方法は慣用の技術、例えば細胞の超音波破碎、可溶化抽出、硫酸分画、各種クロマトグラフィーなどの操作により達成し得る。

【0036】すなわち、上記のような方法で融合ポリペプチドを効率よく発現させた場合、産生される融合ポリペプチドは菌体内で不溶性顆粒を形成する。該不溶性顆粒は、菌体を生理食塩水などの生理的条件の緩衝液に懸濁した後、超音波処理などの方法で細胞を破碎し、この菌体破碎物を遠心分離することにより沈殿物として回収される。

【0037】回収された不溶性顆粒を、低濃度の尿素または塩酸グアニジン、あるいはTrition X-100などの界面活性剤を含む緩衝液で洗浄することにより高純度の融合ポリペプチドが得られ、さらに不溶性顆粒を形成している該融合ポリペプチドに6M~8Mの尿素もしくは同濃度の塩酸グアニジンを含む緩衝液を加えることにより可溶化することができる。可溶化された融合ポリペプチドは、生理食塩水などの緩衝液に対して透析あるいは希釈して、尿素あるいは塩酸グアニジンを適当な濃度以下に下げることにより、該融合ポリペプチドを免疫原として利用できる。さらに該融合ポリペプチドは、公知の蛋白質の精製方法、例えば塩析、イオン交換、ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィーによる分離法や高速液体クロマトグラフィー、電気泳動などによる分画法を適宜組み合わせ用いることにより、高純度の融合ポリペプチドとした後、免疫原として利用することもできる。

【0038】また、非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質遺伝子断片とT r p E遺伝子の間に、化学的切断法あるいは酵素的切断法によって切断されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を挿入しておけば、上記の如く産生された融合ポリペプチドを、適当な方法で処理することにより非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質遺伝子断片にコードされる、配列番号1のアミノ酸配列を含む非A非B型肝炎ウイルス抗原活性ポリペプチドをT r p E部分を含まない形で得ることが可能となる。尚、配列番号1に示されるアミノ酸配列の一部の領域について、置換あるいは挿入、欠損した配列が存在したとしても、そのポリペプチドの抗原活性が、本配列を含むポリペプチドと実質的に同等である場合には、本発明に包含される。

【0039】本発明でいう非A非B型肝炎ウイルス抗原活性を有するポリペプチドとは、抗非A非B型肝炎ウイルス抗体と免疫学的に反応するポリペプチドもしくは融合ポリペプチドを意味し、本発明のハイブリドーマならびにそれから得られるモノクローナル抗体の作製に利用するための抗原として用いられる。具体的には、配列番号1のアミノ酸配列を含む非A非B型肝炎ウイルス抗原活性を有する融合ポリペプチドもしくは配列番号1のアミノ酸配列の一部を含む非A非B型肝炎ウイルス抗原活性を有するポリペプチドであり、そのN末端あるいはC末端に余分なアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。配列番号1のアミノ酸配列の部分配列としては、例えば配列3～5に示される配列が好適である。

【0040】本発明の上記融合ポリペプチドならびに配列番号3～5に示されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対するモノクローナル抗体類は、当業者により容易に調製することができる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製は良く知られている。例えば、BALB/cマウスなどの腹腔内あるいは皮内に、上記融合ポリペプチドもしくはポリペプチド（以下、本抗原）を単独もしくはBSA、KLHなどと結合させた抗原として、フロイント完全アジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で、追加免疫として本抗原を尾静脈内に投与し、無菌的に脾臓を摘出した後、適当なマウス骨髄腫細胞株と細胞融合し、ハイブリドーマを得る。本方法は、KohlerとMilsteinの方法（Nature 256:495-497, 1975）に従って行なうことができる。

【0041】したがって、本発明はまた、非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。より特定的には、ハイブリドーマ細胞系はHC11-5E3（FERM P-14415）、HC11-5F11（FERM P-14416）、HC11-515S（FERM P-14403）及びHC11-1080S（FERM P-14402）から選択され得る。

【0042】上記方法により得られたハイブリドーマ細胞株を適当な培養液中で培養し、その後、本抗原に対して特異的な反応を示す抗体産生ハイブリドーマ細胞株を選択してクローン化する。抗体産生ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法のほか軟寒天法（Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976）などを利用することができる。そして、産生されたモノクローナル抗体をプロテインAなどを用いたカラムクロマトグラフィーなどの方法により精製する。

【0043】したがって、本発明はさらに、上記ハイブリドーマ細胞系によって産生される、非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位に対し結合特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【0044】このような抗原決定部位の具体例としては、配列番号1, 3, 4又は5に示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも3個の連続するアミノ酸から構成される配列が挙げられる。本発明のモノクローナル抗体は、非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質との抗原-抗体複合体の結合定数 K_A が 5×10^7 [M⁻¹]以上であるものが好適に使用される。具体的には、モノクローナル抗体は、上記特定のハイブリドーマ細胞系が分泌する5E3, 5F11, 515S及び1080Sから選択され得る。

【0045】本発明はさらにまた、このようなモノクローナル抗体の製造方法をも提供し、該方法は、非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質で免疫したマウスから誘導されるリンパ球とミエロマ細胞とを融合することにより上記定義のハイブリドーマ細胞系を作製し、この細胞系を培養して非A非B型肝炎ウイルスCORE構造蛋白質上の抗原決定部位と特異的に結合するモノクローナル抗体を分泌させ、これを精製することを包含する。

【0046】免疫原の具体例としては、配列番号1, 2, 3, 4又は5に示されるアミノ酸配列又はその部分配列を有する（ポリ）ペプチドが挙げられる。

【0047】あるいは、上記の方法以外にもモノクローナル抗体はファージ表面提示系を用いても作製することができる（Nature, 348:552-554, 1990; Nature, 349:293-299, 1991）。すなわち、免疫されたマウスの脾臓を摘出し、そこから慣用の方法（例えばグアニジンチオシアネート法、フェノール抽出法等）によりRNAを調製し、常法によりmRNAを含む分画であるpolyA RNAを調製する。ここで上記の方法で樹立したハイブリドーマ細胞を脾臓のかわりに用いることも可能である。調製したmRNAを鋳型にcDNAを合成し、免疫グロブリンの長鎖及び短鎖の可変領域を増幅できるような適当なプライマーを用い、PCRリアクションによりそれぞれの可変領域を取り出す。増幅されたDNA断片は遺伝子工学的手法を用いて結合した後、例えばpCANTAB5

E (ファルマシア社製) のようなファージ表面提示を可能にする発現ベクターに組み込み大腸菌を宿主として発現させることが可能となる。可変領域の提示されたファージの内、ポリペプチドに結合するもののみを選択することにより、マウス細胞で作られるものと同等のペプチドに結合する能力を持つモノクローナル抗体を作製することができる。

【0048】本発明に従って調製されたモノクローナル抗体は、検体中の非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質の検出および定量用に、エンザイムリンクイムノソルベントアッセイ (ELISA)、酵素イムノドットアッセイ、ラジオイムノアッセイ、凝集に基づいたアッセイ、あるいは他のよく知られているイムノアッセイ法で検査試薬として用いることができる。また、検出にはほとんどの場合、標識化抗体が使用され、このために標識化を行なう際、標識化合物としては例えば当分野で公知の酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、染色物質などが使用される。

【0049】検体としては、全血、血清、血漿などの生物学的体液及び肝臓組織などが含まれる。

【0050】本発明は、上記イムノアッセイを実施するための、すなわち、検体中の非A非B型肝炎ウイルス又はその関連抗原を検出又は定量するための検査キットを提供する。キットには、少なくとも上記定義の本発明のモノクローナル抗体が含まれる。また、抗体は標識化第二抗体として含まれてもよい。

【0051】例えば、検体中の非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質を検出するために二抗体サンドイッチ反応系を用いる場合、使用すべき検査キットは、固体支持体 (例えばマイクロタイターウェルの内壁) に被覆された本発明のモノクローナル抗体および第二抗体としての標識したモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。モノクローナル抗体としては、前記定義のものが挙げられ、好ましくは、5E3、5F11、515S及び1080Sから選択される。固体支持体に固相化するモノクローナル抗体および標識するモノクローナル抗体の組み合わせは自由であり、高感度の得られる組み合わせを選択できる。

【0052】使用できる固体支持体としてはポリスチレンやポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニール製のマイクロタイタープレート、試験管、キャピラリー、ビーズ (ラテックス粒子や赤血球、金属化合物など)、膜 (リポソームなど)、フィルターなどが挙げられる。

【0053】本発明の非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質の検出または定量のためのイムノアッセイは、検体を物理的および化学的処理により前処理を施すことを含む。すなわち、測定検体にポリエチレングリコール (PEG) を添加して溶解後、遠心分離を行ない、沈殿物にアルカリ溶液を加えて変性させ、検体中の非A非B型肝炎

炎ウイルス由来構造蛋白質を濃縮・分解することにより測定の高感度化が図られる。ここで血清の処理に用いるPEGの平均分子量、およびその使用濃度は多様である。一般によく用いられるPEGの平均分子量は、1000、1500、2000、4000および6000であり、またその濃度は3%~5% (重量%) の範囲で使用される。平均分子量1000~2000までのPEGはゲル状であり、使用する際には加熱により液状にしてからでないことと取扱い難い。これに対してPEG4000と6000は結晶状であるため取扱いが簡単であり本発明の好ましい態様の一つである。また、アルカリ剤としては、限定されないが、例えばアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水酸化物が挙げられる。変性処理時の溶液はpH10以上、好ましくはpH12~14である。

【0054】

【実施例】以下の実施例は本発明を具体的に説明するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

【0055】実施例1

20 非A非B型肝炎ウイルス由来ポリペプチドの発現プラスミドの発現および精製

(A) 発現プラスミドの構築

HCVのCORE領域に相当する発現プラスミドは以下の方法で構築した。C11-C21クローンおよびC10-E12クローン (特開平6-38765号) をpUC119に組み込んで得られたプラスミドpUC-C11-C21およびpUC-C10-E12の各DNA1μgを制限酵素反応液20μl [50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM NaCl, 15単位のEcoRIおよび15単位のClaI酵素] 中、および [10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 15単位のClaIおよび15単位のKpnI酵素] 中で各々37℃1時間消化し、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約380bpのEcoRI-ClaI断片および約920bpのClaI-KpnI断片を精製した。この2つのDNA断片とpUC119をEcoRIおよびKpnIで消化したベクターに10×リガーゼ用緩衝液 [660mM Tris-HCl (pH7.5), 66mM MgCl₂, 100mMジチオスレイトール, 1mM ATP] 5μl, T4リガーゼ1μl (350単位/μl) に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC-C21-E12を得た。

【0056】このプラスミドpUC-C21-E12 DNA1ngを2つのプライマー (5'-GAATTCATGGGCACGAATCCTAAA-3', 5'-TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC-3') 50

を用いPCRを行なう。PCRはGeneAmp™ (DNA Amplification Reagent Kit, Perkin Elmer Cetus製)のキットを用いDNA変性95℃ 1.5分、アニーリング50℃2分、DNA合成70℃3分の条件で行ない、得られたDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動により分解し、ガラスパウダー法 (Gene Clean) で精製した。一方、pUC19を制限酵素SmaIで消化し、PCR法によって得られたDNA断片を10×リガーゼ用緩衝液 [660mM Tris-HCl (pH7.5)、66mM MgCl₂、100mM ジチオスレトール、1mM ATP] 5μl、T4リガーゼ1μl (350単位/μl) に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC19・C21-E12・SmaIを得た。このプラスミドDNA1μgを制限酵素反応液20μl [150mM NaCl, 6mM Tris-HCl (pH7.5), 6mM MgCl₂, 15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素] 中で37℃1時間消化反応を行ない、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約490bpのEcoRI-BamHI断片を分離し、これをガラスパウダー法で精製した。

【0057】次に発現ベクターであるTrp・TrpE (特開平5-84085号) のDNA1μgを制限酵素反応液20μl [150mM NaCl, 6mM Tris-HCl (pH7.5), 6mM MgCl₂, 15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素] 中で37℃で1時間消化し、その反応液に水39μlを加え、70℃で5分間熱処理した後にバクテリアアルカリ性ホスファターゼ (BAP) 1μl (250単位/μl) を加えて37℃で1時間保温した。この反応液にフェノールを加えてフェノール抽出を行ない、得られた水層をエタノール沈殿し、沈殿物を乾燥した。得られたEcoRI-BamHI処理ベクターDNA1μgと上述のCORE140断片を10×リガーゼ用緩衝液 [660mM Tris-HCl (pH7.5), 66mM MgCl₂, 100mM ジチオスレトール、1mM ATP] 5μl、T4リガーゼ 1μl (350単位/μl) に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。

【0058】この反応液の10μlを用いて大腸菌101株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸菌株は塩化カルシウム法 [Mandel, M. とHiga, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)] により作られる。形質転換大腸菌を25μg/mlのアンピシリンを含むLBプレート (1%トリプトン, 0.5% NaCl, 1.5% 寒天) 上に塗布し、37℃に一晩保温した。プレート上に生じた菌

のコロニーを1白金耳取り、25μg/mlのアンピシリンを含むLB培地に移し、一晚37℃で培養した。

1. 5mlの菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレパレーションをアルカリ法 [Manniatistら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)] により行なった。得られたプラスミドDNA1μgを制限酵素反応液20μl [150mM NaCl, 6mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂, 15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素] 中で37℃、1時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって、約490bpのEcoRI-BamHI断片が生じるTrp・TrpE CORE140発現プラスミドを選別した。

【0059】(B) クローンCORE140でコードされるポリペプチドの発現および精製

発現プラスミドTrp・TrpE CORE140をもつ大腸菌HB101株を50μg/mlのアンピシリンを含む3mlの2YT培地 (1.6% トリプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl) に接種し、37℃で9時間培養する。この培養液1mlを50μg/mlのアンピシリンを含む100mlのM9-CA培地 (0.6% Na₂HPO₄, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.1mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 0.5% カザミノ酸, 0.2% グルコース) に植え継ぎ、37℃で培養した。OD₆₀₀ = 0.3の時に終濃度40mg/lになるようにインドールアクリル酸を加え、さらに16時間培養した。この培養液を遠心分離して菌体を集めた。

【0060】菌体に20mlの緩衝液A [50mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA, 30mM NaCl] を加えて懸濁し、再び遠心分離を行なって発現菌体2.6gを得た。得られた菌体を緩衝液A 10ml中に懸濁し、超音波破碎により大腸菌膜を破碎した後に遠心分離を行ない、非A非B型肝炎ウイルスcDNAでコードされるポリペプチドとTrpEの融合ポリペプチドを含む不溶性画分を得た。その画分に10mlの6M尿素を含む緩衝液Aを加えて融合ポリペプチドを可溶化抽出した。可溶化した抽出物をS-Sepharoseを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけてNaClの0M~0.5Mまでの濃度勾配によりカラムから溶出させ、融合ポリペプチドの精製を行なった。

【0061】実施例2
ハイブリドーマの作製法

前記方法により調製した融合ポリペプチド (TrpC11) を生理食塩水に終濃度が1.0mg/mlとなるように溶解し、等量のフロインド完全アジュバンドと混和し、TrpC11懸濁液とした。TrpC11濃度が

0.01~0.05mg/mlとなるように調製した該懸濁液を4~6週令のBALB/c系マウスに腹腔内投与した。さらに約8週間後、免疫化動物にTrpC11濃度が0.005~0.03mg/mlとなるように調製した生理食塩水溶液を尾静脈内に投与した。最終追加免疫後3日目に、この免疫動物より無菌的に脾臓を摘出し、ハサミで切片としてさらにメッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、RPMI-1640培地で3回洗浄した。8-アザグアニジン存在下で数日間培養し、復帰突然変異体を完全に除いた対数増殖期のマウス骨髓腫細胞株PAIを前記と同様に洗浄後、該細胞 1.8×10^7 個と脾臓細胞 1.0×10^8 個を50ml容の遠心管に入れ混合した。200×g、5分間遠心分離を行ない、上清を除去し、37℃に保温した50% ポリエチレングリコール(PEG)4000(メルク社製)を含むRPMI-1640培地1mlを加えて細胞融合させた。融合細胞は、遠心分離(200×g、5分間)によってPEGを除いた後、96ウェルプレートを用いて、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(以下、HATと略す)を含むRPMI-1640培地中で1~2週間培養してハイブリドーマのみを増殖させた。その後、HATを含まない培地で成育させ、約2週間後目的の抗体を産生するクローンをELISA法により検索し、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【0062】得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索および単一クローン化を行ない、得られたハイブリドーマをHC11-5E3, HC11-5F11, HC11-515SおよびHC11-1080Sと命名した。該4種

*30

表1

抗 体	認 識 部 位
5 E 3	²⁵ Pro- ³⁵ Tyr (配列番号3)
5 F 1 1	⁵¹ Lys- ⁶⁰ Gly (配列番号5)
5 1 5 S	²⁵ Pro- ³⁵ Tyr (配列番号3)
1 0 8 0 S	³⁰ Ile- ⁵⁰ Arg (配列番号4)

実施例4

ウエスタン・ブロッティング法による抗体の反応特異性の証明

HCV・CORE領域由来のポリペプチド粗精製物を、ドデシル硫酸ナトリウムを用いる電気泳動法(SDS-PAGE法)により電気泳動後、ゲルをポリビニリデンフルオリド膜(PVDF膜、ミリポア社製)と密着させ、ゲル側を陰極、PVDF膜側を陽極としてトランスファーし、ゲルに泳動された蛋白質をPVDF膜に転写した。転写されたPVDF膜を4% ブロックエース(雪印乳業社製)、2% BSAを含む0.1M リン酸緩衝液(pH7.4)に4℃で一晩浸してブロッキ

*類のハイブリドーマに関しては、工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託し、それぞれ受託番号FERMP-14415、FERMP-14416、FERMP-14403及びFERMP-14402を得た。なお、前二者は平成6年7月5日付けで、また後二者は平成6年6月29日付けで寄託された。

【0063】実施例3

モノクローナル抗体の作製法

実施例2に記載の方法により得られたハイブリドーマをプリスタン等で処理したマウス腹腔に移植し、腹水中に産生されてくるモノクローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体の精製は常法に従い、硫酸沈殿を行ない、リン酸緩衝液等により透析した後、プロテインAを結合させたセファロースカラムによりIgGフラクションを分離した。前記4種類のハイブリドーマから産生されたそれぞれのモノクローナル抗体、5E3、5F11、515Sおよび1080Sのイソタイプは、ウサギ抗マウスIgG各イソタイプ抗体(Zymed社製)を用いた二重免疫拡散法により、5E3および5F11がIgG2a、515Sおよび1080SがIgG1であることが明らかとなった。得られた4種類のモノクローナル抗体について、HCV・CORE領域由来の配列によって合成した20のペプチドを用いてエピトープ解析を行なった結果、表1に示す如くCORE領域の一部を特異的に認識するモノクローナル抗体であることがわかった。

【0064】

【表1】

グを行ない、0.05% Tween20を含むpH7.0のトリス塩酸緩衝液(以下TBS)で洗浄後、一次抗体として実施例3で得られたモノクローナル抗体を室温で1時間反応させた。反応後、PVDF膜をTBSでよく洗浄し、2% ポリビニルピロリドン、0.05% Tween20を含むPBS(-)で5000倍希釈した酵素標識抗マウスIgG+M抗体を二次抗体として室温で1時間反応させた。次いで、PVDF膜をTBSで洗浄し、0.1% 4クロロ1ナフトール溶液および0.2% 過酸化水素溶液により発色させた。尚、陽性対照として非A非B型肝炎患者血清を用い、陰性対照として抗マウスIgG抗体に代えて、抗ヒトIgG抗体

を用いて試験した。

【0065】モノクローナル抗体と非A非B型肝炎患者血清（陽性ならびに陰性検体）によるウエスタンブロット像を図1に示した。モノクローナル抗体および陽性検体にのみ強い反応が見られ、モノクローナル抗体はTrpC11を特異的に認識していることが示された。

【0066】実施例5

β-ガラクトシダーゼ標識モノクローナル抗体の作製法

(A) 5E3F(ab')₂の調製法

抗HCV・CORE抗体（マウスモノクローナル抗体：5E3IgG）を標識用に用いるため、該抗体10mgを0.2M NaClを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.0）で透析後、Centricon10（アミコン社製）を用いて、容量が1mlになるように遠心濃縮した。この抗体溶液に、0.2M NaClを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.0）で懸濁したペプシン（シグマ社製）をIgG量に対して4%になるように添加し、37℃で1.5時間反応させた。反応終了後、0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）で平衡化したSephadex G-150（φ1.6×60cmファルマシア社製）を通すことによりF(ab')₂のフラクションを分画した。得られたフラクションを1mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）で透析後、Centricon10を用いて、容量が1mlになるように遠心濃縮し、5E3F(ab')₂として標識体の作製に用いた。この方法により10mgの5E3IgGから約5mgのF(ab')₂を調製した。

【0067】(B) 5E3-β-ガラクトシダーゼ標識体の作製法

前記の方法で調製した5E3F(ab')₂ 5mgに1mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）で溶解した0.1M 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩（キシダ化学社製）溶液を0.1ml添加し、37℃で90分反応させた。1mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）で平衡化したSephadex G-25（φ1.5×20cmファルマシア社製）を用いFab'を精製した。Fab'フラクションを分画し、Centricon10を用いて、容量が1mlになるように遠心濃縮した。一方、β-ガラクトシダーゼ（ペーリンガー社製）は、蛋白質量として10mgを秤量し、1mlの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）に溶解した。

【0068】この溶液に、終濃度が50mg/mlになるようにN、N'-ジメチルホルムアミド（キシダ化学社製）で溶解したN、N'-（1,2-フェニレン）ビスマレイミド（和光純薬社製）10μl添加し、30℃20分反応させることによってβ-ガラクトシダーゼのSH基をマレイミド化した。0.1Mリン酸ナトリウム

緩衝液（pH6.0）で平衡化したSephadex G-25（φ1.5×20cm）を用いてβ-ガラクトシダーゼのフラクションを精製し、Centricon10を用いて遠心濃縮した。

【0069】このようにして得られた5E3Fab'とβ-ガラクトシダーゼをモル比で約4:1になるように混合し、4℃で15~24時間反応させた。その後、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を反応液中2mMになるように添加し、37℃で20分反応することによって、未反応のマレイミド基のブロックを行なった。次に、0.1M NaCl, 0.1% BSA, 1mM MgCl₂・6H₂O, 0.1% NaN₃を含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.7）、以下緩衝液A、で平衡化したSephacrose 6B（φ1.6×65cmファルマシア社製）で溶出する事によって未反応の5E3Fab'を除去し、5E3-β-ガラクトシダーゼ標識体の精製を行なった。

【0070】(C) β-ガラクトシダーゼ活性測定法

β-ガラクトシダーゼ活性の測定は、0.3mlの10mM MgCl₂と、終濃度が5.9mg/mlになるように50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.8）に懸濁した2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド（和光純薬社製）0.4mlと10Mメルカプトエタノール（和光純薬社製）30μlを含む50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.8）2.93mlの混液に標識体50μlを加えて合計2.98mlとし、37℃で5分間、405nmにおける吸光度の差（ΔAbs）を測定することによってRate Assayを行なった。

30 【0071】実施例6

固相作製法

抗HCV・CORE抗体（マウスモノクローナル抗体：5F11IgG）を終濃度が2.5μg/mlになるように0.1% NaN₃を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）で希釈し、固相用チューブ（ヌンク社製、スターチューブ）1本につき300μlずつ分注した。4℃で一晩静置後、0.15M NaCl, 0.05% Tween20を含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、以下洗浄液、2mlを用いて2回洗浄し、0.5%カゼイン-Na、1%ショ糖を含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、以下ブロッキング液、2mlを添加し、さらに4℃で一晩静置した。これを5F11固相担体として以下の測定に用いた。

【0072】実施例7

血清処理法

血清1mlをマイクロ遠心チューブ（エッペンドルフ社製）に分注し、ポリエチレングリコール（PEG）4000（和光純薬社製）を40mg添加した。転倒混和により十分に溶解した後、4℃で3時間静置した。400

0×g、4℃で1時間遠心分離を行ない、上清を除去した。沈澱物を0.5% NaClと0.5% クエン酸ナトリウム混液100μlに懸濁し、0.5N 水酸化ナトリウム溶液を100μl加え、37℃で30分間変性反応させた後、5% Triton X-100を含む0.5M NaH₂PO₄ 100μlを添加することによって中和した。

【0073】実施例8

モノクローナル抗体(5F11、5E3)による非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質の検出および定量

実施例6(固相作製法)に従い、マイクロプレートにモノクローナル抗体(5F11)を感作し、ブロッキング液を添加して4℃で一晩静置することにより5F11固相担体を作製した。これに0.5M NaCl, 2.5mM EDTA・2Na, 1% BSA, 0.5% カゼイン-Na, 5% マウス血清, 0.25% Tween 80を含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、以下反応緩衝液、100μlと実施例1で得られたTrpC11蛋白質を0~100ng/mlの濃度範囲で含む溶液50μlをそれぞれのウェルに加え攪拌し、室温で1時間反応させ、洗浄液300μlで6回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ(POD)標識したモノクローナル抗体(5E3)100μlを添加して室温で1時間反応させた。

【0074】反応後、上記洗浄液300μlで6回洗浄し、基質(オルトフェニレンジアミン、以下OPD)溶液100μlを加え室温で30分間反応させた後、2N 硫酸溶液からなる反応停止液100μlを添加し、波長690nmの吸光度を対照として波長492nmにおける吸光度(A₄₉₂)を測定することによりTrpC11蛋白質を測定した。図2に示す如く、TrpC11蛋白質が濃度依存的に測定されることがわかった。すなわち、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質を検出*

表2

酵 素	基 質	検 出 限 界	
		酵 素	TrpC11
POD	OPD (比色)	30amol/assay	1560pg/ml
POD	HPPA (蛍光)	15amol/assay	1000pg/ml
ALP	pNPP (比色)	30amol/assay	20000pg/ml
ALP	NADP (比色)	10amol/assay	1000pg/ml
ALP	AMPPD (発光)	0.2amol/assay	6000pg/ml
β-Gal	4MUG (蛍光)	0.5amol/assay	400pg/ml

実施例11

モノクローナル抗体(5F11、5E3)を用いた非A

*または定量できることが明らかとなった。

【0075】実施例9

モノクローナル抗体(1080S、515S)による非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質の検出および定量

実施例8に記載の固相担体にモノクローナル抗体1080Sを用い、POD標識用にモノクローナル抗体515Sを用いること以外、実施例8と同様の操作によりTrpC11蛋白質の測定を行なった。図3に示す如く、実施例Aと同様にTrpC11蛋白質が濃度依存的に測定されることがわかった。すなわち、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質を検出または定量できることが明らかとなった。

【0076】実施例10

各種標識酵素による非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質の測定感度の比較

二次抗体の酵素標識用としてPOD、アルカリフォスファターゼ、β-ガラクトシダーゼを用い、基質にOPD、HPPA、pNPP、NADP、AMPPD、4MUGを使用した以外、実施例8と同様の操作によりTrpC11蛋白質の測定を行なった。モノクローナル抗体として1080Sならびに515Sの組み合わせで検討を行なった結果、表2に示す如く、非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質を検出する方法として、二次抗体の酵素標識にはβ-ガラクトシダーゼを用い、基質に4MUGを用いた場合に最も高感度測定が可能であることが示された。また、モノクローナル抗体との組み合わせとしては、5F11を固相担体として、β-ガラクトシダーゼを結合した5E3を二次抗体として用いた場合、もしくは1080Sを固相担体として、β-ガラクトシダーゼを結合した515Sを二次抗体として用いた場合に最も高い測定感度が得られた(図4、5)。

【0077】

【表2】

非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質の検出限界の検討

実施例6の方法で作製した5F11固相担体のブロッキング液を除き、反応緩衝液200 μ lを添加した。これに、実施例1で得られたTrpC11蛋白質を0~5120pg/mlの濃度範囲で含む溶液100 μ lをそれぞれのウェルに加え攪拌し、37℃で10分間攪拌しながら反応させた。洗浄液2mlで2回洗浄した後、緩衝液Aで40mU/ml濃度になるように希釈した5E3- β ガラクトシダーゼ標識体の溶液を300 μ l加え、37℃で9分間攪拌しながら反応させた。洗浄液2mlで洗浄後、洗浄液2mlを添加したままの状態37℃1分間攪拌し、洗浄液を吸引除去後、再度洗浄液2mlで洗浄した。

【0078】次に、0.1mM濃度になるように0.15M NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1% Na₂N₃を含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)、以下4MUG希釈液、で希釈した4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトピラノシド(モレキュラープローブ社製)、以下4MUG、を基質液として300 μ l添加した。37℃で9分間攪拌反応後、0.1M グリシン-NaOH(pH10.3)、以下反応停止液、1mlを添加することによって反応を停止した。ウェル中の5E3- β ガラクトシダーゼ標識体は、4MUGの開裂を引き起こし、蛍光性クマリン生成物を誘導する。従って、該蛍光性クマリン生成物の相対蛍光強度を測定することにより、TrpC11蛋白質の濃度を間接的に測定した。

【0079】蛍光強度の測定は励起波長360nm、放射波長450nmで行なった。蛍光標準液としては、10nM 4-メチルウンベリフェロン(ナカライ社製)、0.1M グリシン-NaOH(pH10.3)溶液を相対蛍光強度100とし、0.1M グリシン-NaOH(pH10.3)溶液を0として用いた。その結果、図6および図7に示す如く5~20pg/mlの濃度範囲に検出限界が存在することが示された。

【0080】実施例12

血清試料中の非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質の測定法

非A非B型肝炎第2世代診断薬(国際試薬社製)で陰性ならびに陽性と判定され、RT(リバーシ・トランスクリプターゼ)-PCR法でPCR-Titerが10⁴~10⁶/mlと測定された血清を用い、血清中の非A非B型肝炎ウイルス構造領域CORE蛋白質の定量を行なった。実施例6の方法で作製した5F11固相担体のブロッキング液を除き、反応緩衝液200 μ lを添加した。これに、実施例7に記載の方法で前処理を行なった血清100 μ lを加え、37℃で10分間攪拌しながら反応させた。洗浄液2mlで2回洗浄した後、緩衝液Aで40mU/ml濃度になるように希釈した5E3- β ガラクトシダーゼ標識体の溶液を300 μ l加え、37℃で9分間攪拌しながら反応させた。洗浄液2mlで洗

浄後、洗浄液2mlを添加したままの状態37℃1分間攪拌し、洗浄液を吸引除去後、再度洗浄液2mlで洗浄した。

【0081】次に、4MUG希釈液で希釈した4MUGを基質液として300 μ l添加した。37℃で9分間攪拌反応後、反応停止液1mlを添加することによって反応を停止し、相対蛍光強度を測定した。蛍光強度の測定は励起波長360nm、放射波長450nmで行なった。蛍光標準液としては、10nM 4-メチルウンベリフェロン(ナカライ社製)、0.1M グリシン-NaOH(pH10.3)溶液を相対蛍光強度100とし、0.1M グリシン-NaOH(pH10.3)溶液を0として用いた。また、標準抗原には実施例1で発現させたリコンビナント抗原(TrpC11蛋白質)を用い、これを8M Ureaを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)にて1mg/ml濃度に溶解した後、反応緩衝液にて目的濃度に調製したものを標準抗原として用いた。図8に示すように、非A非B型肝炎第2世代診断薬で判定された結果とよく一致した。

20 【0082】実施例13

モノクローナル抗体(5F11, 5E3, 1080S, 515S)の反応速度定数の測定

反応速度定数の測定は表面プラズモン共鳴の原理に基づいた生体特異的相互作用分析装置である表面プラズモン共鳴分析装置(BIACore™, ファルマシア社製)により行なった。TrpC11蛋白質を、カルボキシデキストラン層をもつセンサーチップCM5へアミンカップリング法で固定化し、HBS緩衝液(10mM HEPES, 3.4mM EDTA, 150mM NaCl, 0.005% Tween20, pH7.4)で適当な濃度に希釈したモノクローナル抗体を25分間流した。このとき、抗体がセンサーチップ上のTrpC11蛋白質へ結合することによって上昇する共鳴シグナル値を30秒毎に経時的に測定し、同時に共鳴シグナル変化率も計算して記録した。1種類の抗体について濃度の異なる5~10種類の試料について同様の測定を繰り返し、親和速度定数を求めた。

【0083】一方、解離速度定数の測定は、TrpC11蛋白質を固定化したセンサーチップに、HBS緩衝液で100 μ g/mlに希釈したモノクローナル抗体を15分間流して抗体をセンサーチップ上のTrpC11蛋白質へ結合させた。これに、HBS緩衝液を50分間流し、抗体がセンサーチップ上のTrpC11蛋白質から解離することによって生ずる共鳴シグナル変化を60秒毎に経時的に測定した。測定により求められた親和速度定数と解離速度定数との比を計算して結合定数を算出した(表3)。

【0084】表3から明らかなように、試験したモノクローナル抗体は10⁸(M⁻¹)オーダー以上の結合定数を持ち、目的抗原との高親和性を示す。

【0085】

【表3】

表 3

抗 体	親和速度定数	解離速度定数	結合定数
	$K_{+1} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{-1} (s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$
5 E 3	2.2×10^5	$< 10^{-5}$	$> 2.2 \times 10^{10}$
5 F 1 1	4.1×10^4	5.7×10^{-5}	7.2×10^8
5 1 5 S	8.1×10^4	$< 10^{-5}$	$> 8.1 \times 10^9$
1 0 8 0 S	1.9×10^5	2.3×10^{-4}	8.3×10^8

【0086】

【発明の効果】本発明により非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質上の抗原決定基に対する結合特異性を有したモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系が得られる。また本発明により得られた有用なモノクローナル抗体は、非A非B型肝炎の患者血清中の非A非B型肝炎ウイルス構造蛋白質を特異的に認識するため、非A非B型肝炎の各種免疫学的診断薬の抗体として広く応用することができる。さらに、本発明により得られたモノク*

10 *ローナル抗体を用いた非A非B型肝炎ウイルスの検出ならびに定量方法を利用することにより非A非B型肝炎の確定診断が行なえる。

【0087】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：140

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Pro Glu
 1             5             10             15
Phe Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr
      20             25             30
Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val
      35             40             45
Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
      50             55             60
Ala Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg
      65             70             75             80
Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro
      85             90             95
Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly
      100            105            110
Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp
      115            120            125
Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile
      130            135            140

```

配列番号：2

配列の長さ：123

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

40

配列

```

Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1             5             10             15
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
      20             25             30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
      35             40             45
Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg Pro
      50             55             60
Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly

```

25 26
65 70 75 80
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
85 90 95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110
Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile
115 120

配列番号：3

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*10

配列

Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr
1 5 10

配列番号：4

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly
1 5 10 15
Val Arg Ala Thr Arg
20

配列番号：5 配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

★トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：ペプチド

配列

Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly
1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】非A非B型肝炎患者血清検体を用いたウエスタンブロットのテスト結果を示す写真である。図中1, 2, 3, 4は検体のレーンを示す。

【図2】本発明のモノクローナル抗体5F11, 5E3を用いたサンドイッチ反応系による非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質 (TrpC11) の検量線図である。バーは2SDを示す。

【図3】本発明のモノクローナル抗体1080S, 515Sを用いたサンドイッチ反応系による非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質 (TrpC11) の検量線図である。バーは2SDを示す。

【図4】本発明のモノクローナル抗体5F11を固相化し、 β -ガラクトシダーゼ (GAL) 標識した5E3を用いたサンドイッチ反応系による非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質 (TrpC11) の検量線図である。バーは2SDを示す。

【図5】本発明のモノクローナル抗体1080Sを固相

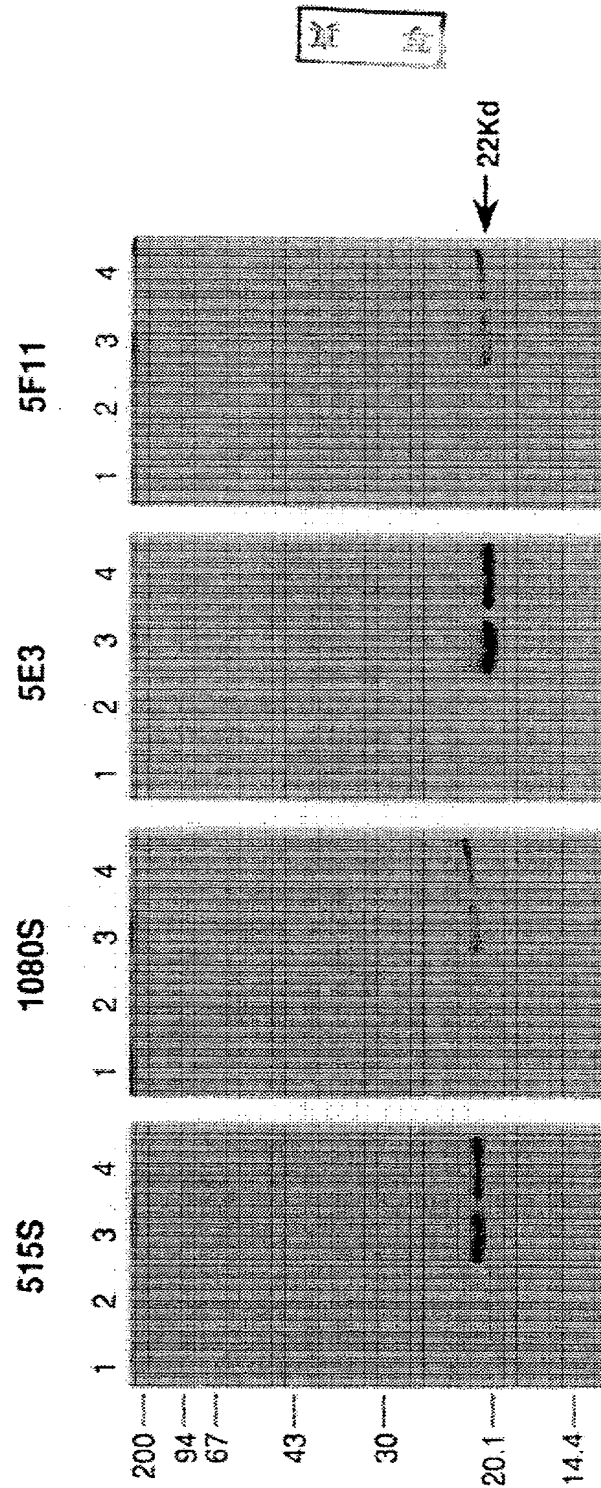
化し、 β -ガラクトシダーゼ (GAL) 標識した515Sを用いたサンドイッチ反応系による非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質 (TrpC11) の検量線図である。バーは2SDを示す。

【図6】本発明のモノクローナル抗体5F11と5E3を用いたサンドイッチ反応系による非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質 (TrpC11) の検出限界を示す図である。濃度範囲0~6000pg/ml。

【図7】本発明のモノクローナル抗体5F11と5E3を用いたサンドイッチ反応系による非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質 (TrpC11) の検出限界を示す図である。濃度範囲0~400pg/ml。

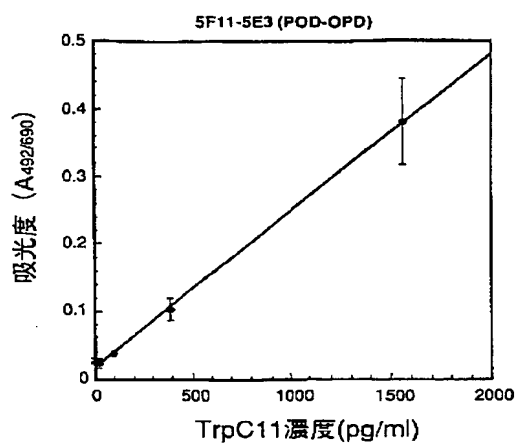
【図8】血清試料中の非A非B型肝炎ウイルス由来構造蛋白質の測定結果を示す図である。検体番号にNがついている検体は、非A非B型肝炎第2世代診断薬で陰性と判定された検体を示し、Pは陽性と判定された検体を示す。

【図1】

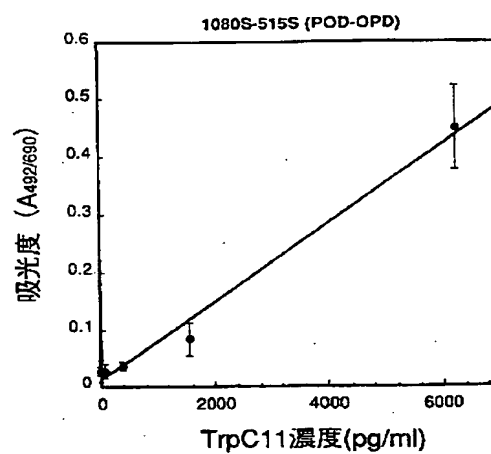


BEST AVAILABLE COPY

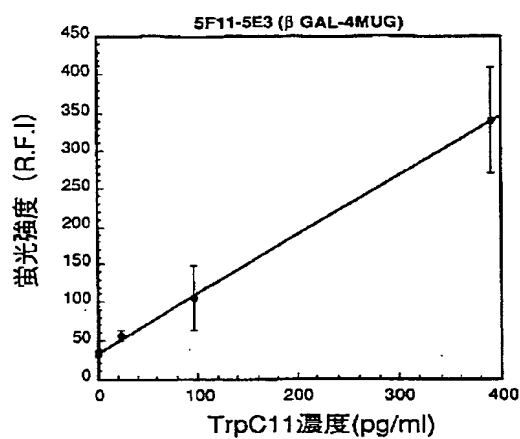
【図 2】



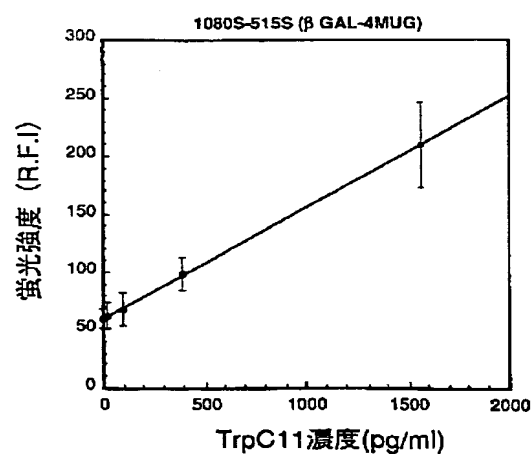
【図 3】



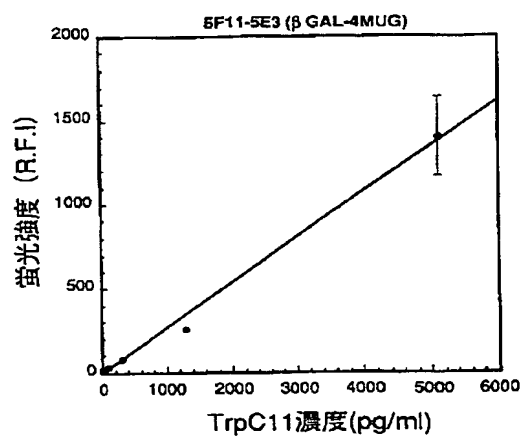
【図 4】



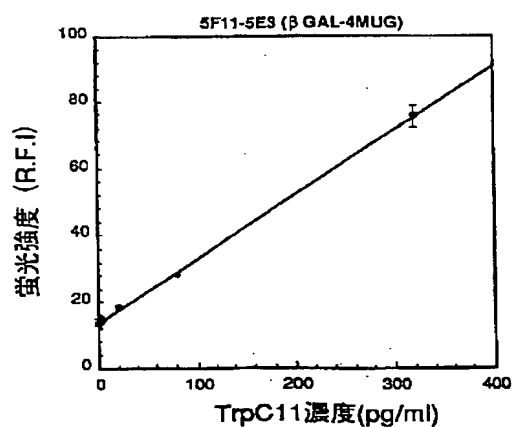
【図 5】



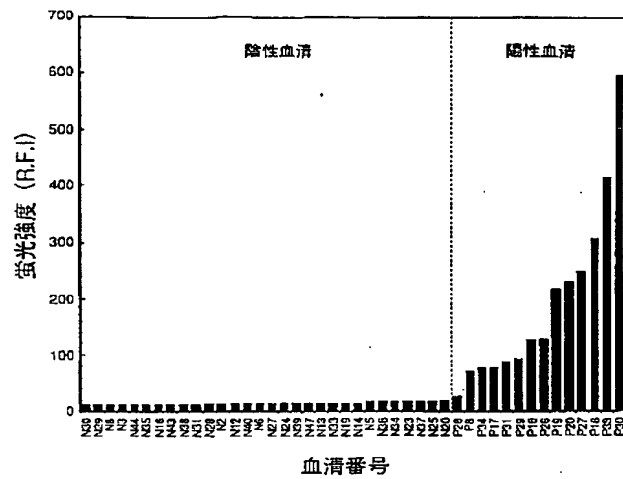
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(72) 発明者 長谷川 明
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目 3 番 1
号 東燃株式会社総合研究所内

(72) 発明者 梶田 忠宏
兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際
試薬株式会社研究センター内

(72) 発明者 太田 陽介
兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際
試薬株式会社研究センター内

(72) 発明者 森 浩之
兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際
試薬株式会社研究センター内

BEST AVAILABLE COPY